昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, June 2015, 58(6): 593 - 602 doi:10.16380/j.kcxb.2015.06.002

禾谷缢管蚜 ABC 转运蛋白基因的克隆、分子特性及表达分析

康新乐，李玉婷，王 康，张 蒙，段辛乐，彭 雄，陈茂华*

（西北农林科技大学植物保护学院，农业部西北黄土高原作物有害生物综合治理重点实验室，陕西杨凌 712100）

摘要：【目的】ABC(ATP-binding cassette)转运蛋白是一类重要的跨膜蛋白超家族，某些 ABC 转运蛋白基因在一些害虫的抗药性品系中表达显著提高。本研究旨在克隆禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi* ABC 转运蛋白基因 *RhpaABCG9*，*RhpaABCG20* 和 *RhpaABCG23* cDNA 全序列，分析这 3 个基因在该虫不同发育阶段和不同抗药性品系中的表达模式，为阐明 ABC 转运蛋白在禾谷缢管蚜抗药性中的作用和其他生理功能，以及深入分析该虫抗药性机理奠定基础。【方法】采用 RT-PCR 与 RACE 技术，克隆了基因 cDNA 全序列；利用实时荧光定量 PCR 技术，研究这 3 个基因在禾谷缢管蚜不同生长发育阶段和不同抗药性品系中的表达变化。【结果】获得了 *RhpaABCG9*，*RhpaABCG20* 和 *RhpaABCG23* 3 个基因 cDNA 全序列，其开放阅读框长度分别为 2 103，2 436 和 2 082 bp，分别编码 700，811 和 693 个氨基酸。结构分析表明，3 个蛋白均具有 ABC 转运蛋白家族典型的结构特征；系统进化分析结果显示，3 个蛋白氨基酸序列分别与豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* 各对应氨基酸的序列一致性最高。实时荧光定量 PCR 分析结果表明，这 3 个基因在禾谷缢管蚜不同发育时期均不同程度表达。*RhpaABCG20* 在各个发育时期的表达变化差异不显著；*RhpaABCG9* 表达量在 4 龄若蚜最高，在 1 龄若蚜最低；*RhpaABCG23* 表达量在 3 龄若蚜最高，1 龄若蚜最低，其他阶段差异不显著。禾谷缢管蚜异丙威抗性品系中，*RhpaABCG20* 表达量显著高于敏感品系，而 *RhpaABCG9* 和 *RhpaABCG23* 表达量均低于敏感品系，但差异不显著；禾谷缢管蚜吡虫啉抗性品系中，*RhpaABCG20* 和 *RhpaABCG23* 表达量显著高于敏感品系，而 *RhpaABCG9* 表达上调不显著。【结论】*RhpaABCG9*，*RhpaABCG20* 和 *RhpaABCG23* 基因可能参与禾谷缢管蚜体内农药的运输，并与禾谷缢管蚜的抗药性具有一定的关系。本研究结果为进一步深入分析禾谷缢管蚜的抗药性机制，以及该虫的抗药性治理与综合防治奠定了基础。

关键词：禾谷缢管蚜；ABC 转运蛋白；基因克隆；表达分析；杀虫剂抗性

中图分类号：Q966 **文献标识码：**A **文章编号：**0454-6296(2015)06-0593-10

Molecular cloning, characterization and expression analysis of ATP-binding cassette transporter genes in the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae)

KANG Xin-Le, LI Yu-Ting, WANG Kang, ZHANG Meng, DUAN Xin-Le, PENG Xiong, CHEN Mao-Hua* (Key Laboratory of Crop Pest Integrated Pest Management on the Loess Plateau of Ministry of Agriculture, College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract:【Aim】The ABC (ATP-binding cassette) transporters are important transmembrane proteins encoded by a supergene family. The expression of some ABC transporter genes significantly increase in some insecticide resistant strains of insect species. This study aims to clone the full cDNA of ABC transporter genes *RhpaABCG9*, *RhpaABCG20* and *RhpaABCG23* of the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi*, and to analyze their expression patterns in different developmental stages and different insecticide resistant strains. The results will provide a theoretical knowledge to clarify the biological functions of ABC transporters of *R. padi*, especially their roles in the resistance to insecticides

基金项目：国家自然科学基金项目(31272036, 31471766)；教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目(20110204110001)

作者简介：康新乐，男，1989 年生，山东济宁人，硕士研究生，研究方向为昆虫毒理学与分子生物学，E-mail：kangxin_le@yeah.net

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：maohua.chen@nwsuaf.edu.cn

收稿日期 Received：2015-02-10；接受日期 Accepted：2015-04-29

of this insect. 【Methods】RT-PCR and RACE were used to clone the full-length cDNAs of three ABC transporter genes from *R. padi*. The expression levels of the three genes in different developmental stages and different insecticide resistant strains of this aphid were detected by real-time quantitative PCR. 【Results】The cDNAs of *RhpaABCG9*, *RhpaABCG20* and *RhpaABCG23* have an open reading frame (ORF) of 2 103, 2 436 and 2 082 bp with the deduced amino acid sequence of 700, 811 and 693 residues, respectively. Structural analysis showed that all the three proteins have the typical structural features of ABC transporter family. Phylogenetic analysis indicated that the amino acid sequences of these three proteins show high identity to those of the corresponding proteins from *Acyrthosiphon pisum*. Real-time quantitative PCR analysis showed that the three genes were expressed differently in different developmental stages. The expression level of *RhpaABCG20* was not significantly different in various developmental stages. The expression level of *RhpaABCG9* was the highest in the 4th instar nymphs and the lowest in the 1st instar nymphs. The expression level of *RhpaABCG23* was significantly higher in the 3rd instar nymphs and significantly lower in the 1st instar nymphs than those in other instar nymphs, while there was no significant difference among the other instar nymphs. Compared with that in the susceptible strain, the expression level of *RhpaABCG20* in the isoprocarb resistant strain of *R. padi* was significantly up-regulated, whilst the expression levels of *RhpaABCG9* and *RhpaABCG23* were insignificantly down-regulated. The expression levels of *RhpaABCG20* and *RhpaABCG23* in the imidacloprid resistant strain were significantly higher than in the susceptible strain, whilst the expression level of *RhpaABCG9* was not significantly up-regulated in the resistant strain. 【Conclusions】*RhpaABCG9*, *RhpaABCG20* and *RhpaABCG23* may play roles in the transport of insecticides in *R. padi*, and be related to the resistance of this pest to insecticides. The results provide a foundation for further study of the resistance mechanisms, and for the resistance management and integrated pest management of *R. padi*.

Key words: *Rhopalosiphum padi*; ABC transporter; gene cloning; expression analysis; insecticide resistance

ABC 转运蛋白(ATP-binding cassette transporter, ABC transporter),又称腺苷三磷酸结合盒转运蛋白,是一类重要的跨膜蛋白超家族,其中大多数 ABC 转运蛋白是初级主动运输转运体。ABC 转运蛋白需要 ATP 的结合与水解产生的能量将底物进行跨膜运输(Dermauw and Van Leeuwen, 2014),其核心结构通常由 4 个结构域组成,包括两个结合并水解 ATP 的胞质核苷酸结合结构域(nucleotide binding domains, NBDs)和两个跨膜结构域(transmembrane domains, TMDs)(Deeley *et al*., 2006; Linton and Higgins, 2007)。NBDs 包含一些保守序列,如 Walker A 和 Walker B 基序、Q-loop、H 基序和 ABC-signature(Linton and Higgins, 2007),TMDs 包含 5 ~ 7 个跨膜螺旋并且参与底物的识别。NBDs 和 TMDs 可以存在于同一个蛋白中,也可以分布在多种蛋白中,前者称为全转运蛋白(full transporter, FT),后者称为半转运蛋白(half transporter, HT)。HT 类型的 ABC 转运蛋白需要同源或者异源多聚体,以形成有功能的 ABC 转运蛋白(Higgins, 1992; Higgins and Linton, 2004; Rees *et al*., 2009)。根据 NBDs 序列的相似性,可以将 ABC 转运蛋白家族划分为 8 个亚家族,分别用 ABC 加上字母 A – H 表示,相应地称为 ABCA – ABCH,其中的 ABCH 亚家族目前仅在节肢动物和斑马鱼中发现(Dean *et al*., 2001; Popovic *et al*., 2010)。真核生物 ABC 转运蛋白介导化合物从细胞质运输到细胞外,或者介导化合物从细胞质进入细胞器,原核生物的 ABC 转运蛋白也能够对物质进行运输。除此之外,有些 ABC 转运蛋白还具有其他的生物学功能,例如,人类的一些 ABC 转运蛋白可以作为离子通道和细胞表面受体,或者在细胞间信号传导、细胞内 DNA 修复、基因的表达调控等过程中起到重要作用(Dean *et al*., 2001; Rees *et al*., 2009)。

目前认为,ATP 的结合与水解是 ABC 转运蛋白进行周期转运的主要方式(Higgins and Linton, 2004; Linton and Higgins, 2007; George and Jones, 2012)。ABC 转运蛋白的转运过程分为 4 步:首先,TMDs 形成高亲和力口袋并与底物结合,从而引起构象变化并传递到 NBDs,形成 NBD 二聚体;然后,闭合的 NBD 二聚体又诱导 TMDs 的构象变化,使得 TMDs 发生旋转而将开口朝向外侧,引发底物转运;随后,ATP 水解引发闭合的 NBD 二聚体分开,导致构象进一步变化;最后,磷酸和 ADP 释放,转运体恢

复到打开 NBD 二聚体的构象(Higgins and Linton, 2004; Linton and Higgins, 2007)。ABC 转运蛋白输送的分子包括糖类,脂质,肽和氨基酸,重金属离子及其共轭物,以及有毒的代谢产物和化学药物。许多人类的 ABC 转运蛋白参与了癌细胞对化疗药物产生耐药性的过程,这些 ABC 转运蛋白包括多药耐药蛋白(multidrug resistance proteins, MDRs)、P-糖蛋白(P-glycoproteins, P-gps)、多药耐药相关蛋白(multidrug-resistance associated proteins, MRPs)和乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)。P-gps 中的 ABCB1 是第一个被发现能够在多药抗性肿瘤细胞系中过度表达的 ABC 转运蛋白(Kartner, 1985; Riordan, 1985; Dean *et al*., 2001)。

相对于细菌、线虫和人类的 ABC 转运蛋白,节肢动物的 ABC 转运蛋白相关研究较少。目前在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*、水蚤 *Daphnia pulex*、西方蜜蜂 *Apis mellifera*、家蚕 *Bombyx mori*、体虱 *Pediculus humanus*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、小菜蛾 *Plutella xylostella*、二斑叶螨 *Tetranychus urticae* 等节肢动物中报道了超过 500 个 ABC 转运蛋白(Dean *et al*., 2001; Roth *et al*., 2003; Sturm *et al*., 2009; Lee *et al*., 2010; Liu *et al*., 2011; Broehan *et al*., 2013; Dermauw *et al*., 2013; You *et al*., 2013),但其中只有少数 ABC 转运蛋白的功能已经明确。黑腹果蝇的 White 基因是第一个被发现涉及到具体生理过程的昆虫 ABC 转运蛋白基因(Ewart and Howells, 1998),其功能丧失会使黑腹果蝇产生白眼表型,这种 ABC 转运蛋白基因参与眼色素前体的运输,并在家蚕和赤拟谷盗上也得到了验证(Tatematsu *et al*., 2011; Broehan *et al*., 2013);另外,黑腹果蝇的 *Scarlet* 和 *Brown* 两个 ABC 转运蛋白基因也被证明参与到眼色素前体的运输过程当中(Tatematsu *et al*., 2011)。

ABC 转运蛋白表达量的增加和害虫抗药性的产生有直接关系。研究显示,与敏感品系相比,有些害虫的抗药品系中某些 ABC 转运蛋白基因的表达量会增加。在小菜蛾毒死蜱和氟虫腈抗性品系中, ABCA,ABCC,ABCG 和 ABCH 亚家族基因表达量上升(You *et al*., 2013);埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 拟除虫菊酯抗性品系中,ABCB,ABCC 和 ABCG 亚家族基因表达增加(Bariami *et al*., 2012);烟粉虱 *Bemisia tabaci* 噻虫嗪抗药品系中 ABCG 亚家族基因表达增加(Yang *et al*., 2013);在桃蚜 *Myzus persicae* 的抗蚜威抗性品系中,成蚜 ABCG 和 ABCH 亚家族基因高表达(Silva *et al*., 2012);阿拉伯按蚊 *Anopheles arabiensis* 和黑腹果蝇 DDT 抗性品系中,ABCG 亚家族基因表达量均增加(Pedra *et al*., 2004; Jones *et al*., 2012)。有报道显示,ABC 转运蛋白与属于 9 种不同化学类别(氨基甲酸酯类、新烟碱类、有机磷、拟除虫菊酯等)的 27 种不同杀虫剂的运输和抗性的介导有联系(Buss and Callaghan, 2008; Dermauw and Van Leeuwen, 2014)。

禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus)是重要的小麦害虫,广泛分布于世界各地。该虫刺吸小麦汁液,使小麦不能灌浆或籽粒不饱满,造成千粒重下降,而且传播大麦黄矮病毒(Barley yellow dwarf virus, BYDV),每年给世界各地的小麦生产造成重大经济损失(Simon *et al*., 1991)。化学杀虫剂喷施是防治禾谷缢管蚜的主要方法,长期大量使用化学杀虫剂已经导致该虫产生抗药性(Chen and Han, 2006)。研究表明,ABC 转运蛋白作为一种外排泵,它的基因表达量上升可以降低细胞内部外源物质的有效浓度(Abo-Elghar *et al*., 2004; Lespine *et al*., 2012; Ardelli, 2013; Pardo-López *et al*., 2013; You *et al*., 2013),导致昆虫对药剂的敏感性下降。ABC 转运蛋白的生理功能在细菌和脊椎动物中已进行了广泛研究,但是在昆虫中研究较少。本研究拟克隆 3 个禾谷缢管蚜 ABC 转运蛋白 G 亚家族基因,并对这 3 个基因进行相关的生物信息学分析,采用实时荧光定量 PCR 的方法研究这 3 个基因在禾谷缢管蚜不同发育时期和不同品系的表达情况,为进一步解析禾谷缢管蚜 ABC 转运蛋白基因的功能,以及以禾谷缢管蚜 ABC 转运蛋白为靶标的干扰剂和抑制剂的开发研究奠定基础。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

供试禾谷缢管蚜为实验室长期饲养种群。实验室用小麦 *Triticum aestivum* L.(小偃 22 品种)苗在人工气候箱内饲养,饲养条件为 23 ± 1℃,相对湿度 40% ~60%,光周期 16L∶8D。禾谷缢管蚜吡虫啉抗性品系(抗性倍数为 42 倍)和异丙威抗性品系(抗性倍数为 18 倍)为本实验室筛选建立,敏感品系在不接触任何杀虫剂条件下长期饲养。

1.2　主要试剂及仪器

97% 吡虫啉(imidacloprid)原药和 96% 异丙威(isoprocarb)原药均购自美国陶氏益农公司,Trizol-

RNA 提取试剂盒购于天根生化科技有限公司；SMART™ RACE 试剂盒购自美国 Clontech 公司；pGEM-T Easy 载体购于美国 Promega 公司；实时荧光定量试剂盒购自瑞士 Roche 公司；胶回收试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司；LA Taq 酶及其他 PCR 相关试剂购于日本 TaKaRa 公司。实验所用引物合成和产物测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。C1000™ Thermal Cycler PCR 仪和荧光定量 PCR 仪 Bio-Rad iQ5 购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 禾谷缢管蚜 *RhpaABCG9*, *RhpaABCG20* 和 *RhpaABCG23* 基因全长的克隆

从敏感品系中随机挑取禾谷缢管蚜无翅成蚜 20 头(约 30 mg)。根据 Trizol 法提取总 RNA，使用琼脂糖凝胶电泳和核酸定量仪进行 RNA 纯度及完整性检测。取 1 μL 的总 RNA 为模板，按照 HiScript® 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒操作说明，获得 cDNA 第一链，于 -20℃保存备用。

本研究通过转录组测序获得 3 个 ABC 转运蛋白基因片段，根据测得的这 3 个片段，利用 Primer Premier 5.0 软件，分别设计 3 个基因的引物(表 1)，对这 3 个基因片段进行克隆验证，克隆这 3 个基因片段时，以新反转录的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，PCR 产物回收纯化后，连接到 pGEM-T Easy 载体，并转化至感受态大肠杆菌 DH5α 中，接种到含有 Amp，X-gal 和 IPTG 的固体 LB 培养基中培养，进行蓝白斑筛选，挑取白斑扩大培养，经酶切鉴定后的阳性克隆送于生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

根据克隆得到的 3 个基因的 cDNA 序列片段，分别设计 3 个基因的 RACE 引物(表 1)，参照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒说明书，进行 3 个基因的 5′-RACE 和 3′-RACE；将 5′-RACE 和 3′-RACE 获得的序列用 DNAMAN 软件拼接成全序列，根据所获得的 cDNA 全序列，从开放阅读框(open reading frame, ORF)两端设计引物(表 1)，对拼接的 cDNA 全序列进行克隆验证，并将获得的基因序列登录到 GenBank 数据库。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5′-3′) Primer sequence	引物用途 Use of primers
RhpaABCG9-F	GTCCTTCGGGATGTGGTA	克隆基因片段 Cloning the fragments of ABC transporter genes
RhpaABCG9-R	ATAATCGTCCTGGGCTTG	
RhpaABCG20-F	TGTTGGACAGGAGTTGGG	
RhpaABCG20-R	GACGGGGATGTGACGAGG	
RhpaABCG23-F	AAGAAGCCAGACAAGCACAT	
RhpaABCG23-R	TCGGGAGATAGAACTCAAAT	
G9-5′RACE S	TCCCGAAGGACCCATTACGGCTAAC	RACE
G9-5′RACE L	CGTTTTACCACATCCCGAAGGACCCAT	
G9-3′RACE S	TGTTCGGCTTCCTTATCGTGTTCAGA	
G9-3′RACE L	TAAACGCACAAGGTGCATCGTTCCCA	
G20-5′RACE S	CCGCCGTCCACTATTCCCACGCTGA	
G20-5′RACE L	AGCAATGAAGGTGGCTGAAACGCAG	
G20-3′RACE S	TGTCAAGTCCCTCGTCACATCCCCG	
G20-3′RACE L	CTTGGGCTTCGTGTCCACCATCTCG	
G23-5′RACE S	CCACAACCACTGGGACCGAGAAGAC	
G23-5′RACE L	TTCTTGGTACAGAGCGAGTTCTTGAGGC	
G23-3′RACE S	TTGCCGATCACGTTGTCCACGGAGTC	
G23-3′RACE L	ACGGGGACCAGTGGCATGTGTTACGG	
RhpaABCG9-F	TGGGCGATCAAGACTACCT	克隆 ORF Cloning the ORF of ABC transporter genes
RhpaABCG9-R	TTCGGATGAAACGCAACAC	
RhpaABCG20-F	GGACGACAAGGATAAGATACGGAAG	
RhpaABCG20-R	AAGTGACGGGGATGTGACGAG	
RhpaABCG23-F	TCACCCGGAATGGCTCTA	
RhpaABCG23-R	CATCCAGATGCGGACAAA	
QRhpaABCG9-F	CTGTTCACCAACCGTCATCG	荧光定量 PCR Real-time PCR
QRhpaABCG9-R	TGTTTCATTTCTTCCGTGCC	
QRhpaABCG20-F	TGCGTTTCAGCCACCTTCAT	
QRhpaABCG20-R	TTGTGCCTTTAGCAACCGTC	
QRhpaABCG23-F	CCCAAGTTTCGGACATTTCAC	
QRhpaABCG23-R	CCATCAATATCGCTCCCACAG	
β-actin-F	CTGCCGCTTCCACCTCATT	
β-actin-R	GATACCGCAAGATTCCATTCC	

1.4 禾谷缢管蚜 ABC 转运蛋白基因的序列与结构分析及分子进化树的构建

利用 ORF finder（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/）分析获得的 cDNA 序列的开放阅读框及蛋白质翻译情况，使用 NCBI Blastx 进行氨基酸序列同源性比对，使用 ProtParam（http://web.expasy.org/protparam/）软件分析 ABC 基因编码的氨基酸序列组成和理化性质，采用 SignalP 4.1 Server（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）软件对禾谷缢管蚜 ABC 转运蛋白的信号肽进行在线预测，利用 Expasy 软件中的 TMHMM Server v.2.0（http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/）工具在线预测 ABC 转运蛋白的跨膜螺旋区，利用 NetPhos 2.0 Server（http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/）程序的磷酸化位点分析功能预测蛋白序列中的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸 3 种氨基酸残基可能的磷酸化位点，利用 NPS 中 SOPMA（https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html）的方法对 ABC 转运蛋白二级结构进行在线预测分析，通过 ScanProsite（http://prosite.expasy.org/scanprosite/）搜索各条基因编码蛋白的特征序列，将 GenBank 数据库中同源性较高的物种氨基酸序列下载并利用 MEGA5.02 软件邻位相接法（neighbor joining，NJ）进行 1 000 次重复分析构建系统发育树。

1.5 禾谷缢管蚜不同发育时期和不同品系 ABC 转运蛋白基因的表达分析

根据 cDNA 序列设计荧光定量特异性引物，以 *β-actin* 基因作为内参基因（表 1）。以禾谷缢管蚜 cDNA 为模板，PCR 扩增含定量引物基因序列的条带，经连接转化测序验证正确后，对模板进行 5 个浓度梯度稀释，稀释倍数为 5，分别制作 ABC 转运蛋白基因和 *β-actin* 基因的标准曲线。采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$法（Schmittgen and Livak，2008）分析数据，以 ddH_2O 代替 cDNA 作为空白对照。荧光定量 PCR 采用 20 μL 体系，包括 SYBR Green Supermix 10 μL，10 μmol/L 的上、下游引物各 0.8 μL；cDNA 模板 1 μL，加 ddH_2O 补齐至 20 μL。定量 PCR 反应条件为：95℃ 10 min；95℃ 10 s，58℃ 15 s，72℃ 15 s 共 40 个循环。PCR 反应结束后，通过熔解曲线判断其特异性。

采用荧光定量 PCR 技术检测 ABC 转运蛋白基因在禾谷缢管蚜 1－4 龄若蚜及无翅成蚜的表达动态。每个发育阶段称取 10 mg 的无翅蚜提取 RNA，反转录成 cDNA 后进行 5 倍稀释，作为荧光定量的模板，每个阶段 3 次重复，以禾谷缢管蚜 1 龄若蚜的表达量为参照。采取同样的方法检测 ABC 转运蛋白基因在禾谷缢管蚜不同品系无翅成蚜的表达动态，以禾谷缢管蚜敏感品系的表达量为参照。

1.6 数据分析与统计

基因表达量差异比较采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析，统计数据以平均值 ± 标准误表示。采用 Duncan 氏新复极差检验和 *T* 检验进行不同发育时期和不同品系基因相对表达量的差异显著性检验。

2 结果

2.1 禾谷缢管蚜 ABC 转运蛋白基因的克隆与序列分析

以禾谷缢管蚜 cDNA 为模板，通过 RACE 技术，分别得到 3 个基因的 cDNA 全序列，序列长度分别为 2 924 bp，3 872 bp 和 2 383 bp，通过 ORF finder 在线软件分析显示，各个基因均具有一个完整的开放阅读框。在 NCBI 上 Blastx 分析发现，这 3 个基因编码的氨基酸序列与豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* 对应的 3 个基因（GenBank 登录号分别为：XP_001946047，XP_001951744 和 XP_001942931）氨基酸序列一致性分别为 96%，97% 和 97%；获得的 3 个蛋白都具有 ABC 转运蛋白的特征序列（Dean *et al.*，2001），说明其均为禾谷缢管蚜 ABC 转运蛋白家族基因。进一步分析发现，其中一个基因的编码产物与 GenBank 数据库中豌豆蚜 *A. pisum*，侧沟茧蜂 *Microplitis demolitor* 和顶切叶蚁 *Acromyrmex echinatior* 的 ABC 转运蛋白 G9 家族蛋白的氨基酸序列一致性分别为 96%，64% 和 64%，将其命名为 *RhpaABCG9*，GenBank 登录号为 KP343868；另一个基因的编码产物与 GenBank 数据库中豌豆蚜 *A. pisum*，内华达古白蚁 *Zootermopsis nevadensis*，顶切叶蚁 *A. echinatior*，印度跳蚁 *Harpegnathos saltator* 和赤拟谷盗 *T. castaneum* 的 ABC 转运蛋白 G20 家族蛋白的氨基酸序列一致性分别为 97%，80%，79%，78% 和 76%，将其命名为 *RhpaABCG20*，GenBank 登录号为 KP343867；第 3 个基因的编码产物与 GenBank 数据库中豌豆蚜 *A. pisum*，丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis*，顶切叶蚁 *A. echinatior*，柑桔木虱 *Diaphorina citri* 和侧沟茧蜂 *M. demolitor* 的 G23 家族蛋白的氨基酸序列一致性分别为 97%，46%，46%，55% 和 44%，将其命名为 *RhpaABCG23*，

GenBank 登录号为 KP343869。*RhpaABCG9*, *RhpaABCG20* 和 *RhpaABCG23* 基因的序列特点见表2。

表 2 禾谷缢管蚜 3 种 ABC 转运蛋白基因的序列特点

Table 2 Sequence characteristics of three ABC transporer genes from *Rhopalosiphum padi*

基因 Gene	cDNA 长度(bp) cDNA size	开放阅读框 ORF	氨基酸长度 Amino acid size	分子量(kDa) Molecular weight	碱性氨基酸 Alkaline amino acids	酸性氨基酸 Acidic amino acids	等电点 pI
RhpaABCG9	2 924	508 – 2 610	700	79.88	60	61	7.04
RhpaABCG20	3 872	270 – 2 705	811	89.71	69	77	5.94
RhpaABCG23	2 383	175 – 2 256	693	77.76	63	64	6.80

利用 SignalP 4.1 Server 软件对禾谷缢管蚜获得的 ABC 转运蛋白的信号肽进行在线预测,结果显示,ABC 转运蛋白基因所编码的蛋白不存在信号肽,为非分泌蛋白。利用 Expasy 软件中的 TMHMM Server v.2.0 工具在线预测 ABC 转运蛋白的跨膜螺旋区,结果表明, RhpaABCG9, RhpaABCG20 和 RhpaABCG23 分别具有 5, 7 和 7 个跨膜螺旋区,属于典型的膜蛋白;功能位点预测结果表明, RhpaABCG9, RhpaABCG20 和 RhpaABCG23 序列中丝氨酸残基可能的磷酸化位点分别为 19, 19 和 16 个,苏氨酸残基可能的磷酸化位点分别为 8, 7 和 4 个,酪氨酸残基可能的磷酸化位点分别为 10, 5 和 5 个。利用 NPS 中 SOPMA 的方法对 ABC 转运蛋白二级结构进行在线预测分析结果显示, RhpaABCG9, RhpaABCG20 和 RhpaABCG23 的 α-螺旋占各自氨基酸比例分别为 42.71%, 38.47% 和 37.37%,无规则卷曲分别占 36.29%, 39.58% 和 31.31%,延伸链占各自氨基酸比例的 15.14%, 15.91% 和 22.94%,β-转角分别占 5.86%, 6.04% 和 8.37%。利用 ScanProsite 对氨基酸序列进行分析,3 个蛋白均具有 ABC 转运蛋白家族典型的结构特征,包括 ABC 转运蛋白家族的标签序列(ABC signature)、ATP 结合位点、跨膜结构域和核苷酸结合结构域等(表 3)。

表 3 禾谷缢管蚜 3 种 ABC 转运蛋白基因编码蛋白的特征序列

Table 3 Signature sequences of three ABC transporters from *Rhopalsiphum padi*

蛋白 Protein	ATP 结合位点位置 Position of ATP binding site	ABC 标签序列位置 Position of ABC signature	核苷酸结合域位置 Position of nucleotide binding domain (NBD)	得分 Score	跨膜结构域位置 Position of transmembrane domain (TMD)	得分 Score
RhpaABCG9	91 – 255	195 – 204	58 – 296	21.122	424 – 631	14.558
RhpaABCG20	125 – 284	224 – 233	89 – 323	19.114	581 – 809	20.694
RhpaABCG23	53 – 203	143 – 152	20 – 242	21.069	457 – 685	9.047

为了分析获得的禾谷缢管蚜 ABC 转运蛋白与其他昆虫 ABC 转运蛋白家族成员的进化关系,将 RhpaABCG9, RhpaABCG20 和 RhpaABCG23 与其他昆虫的 ABC 转运蛋白氨基酸序列进行比对,并用邻位相接法(neighbor joining, NJ)绘制分子系统发育树。从图 1 可以看出,系统发育树分为两大支, RhpaABCG20 和 RhpaABCG23 聚为其中一支, RhpaABCG9 组成另外一支,说明 ABCG20 和 ABCG23 进化关系较近,二者与 ABCG9 进化关系较远。在系统树上, RhpaABCG9, RhpaABCG20 和 RhpaABCG23 分别与豌豆蚜各对应蛋白距离最近(图 1)。

2.2 禾谷缢管蚜 ABC 转运蛋白基因在不同发育时期和不同品系的表达分析

通过 qRT-PCR 分析,目的基因和内参基因的熔解曲线均为单峰,无非特异扩增,扩增效率均接近 100%,相应标准曲线的直线相关性均在 0.99 以上。实时荧光定量 PCR 结果显示, *RhpaABCG9*, *RhpaABCG20* 和 *RhpaABCG23* 在禾谷缢管蚜整个发育历期均有表达,但 3 个基因在不同发育时期表达的变化规律不同(图 2)。*RhpaABCG9* 表达量在 4 龄若蚜最高,1 龄若蚜表达量最低;*RhpaABCG20* 在各个发育时期的表达变化差异不显著;*RhpaABCG23* 表达量在 3 龄若蚜最高,1 龄若蚜表达最低,3 龄若蚜表达量为 1 龄的 6.57 倍,3 龄若蚜表达量显著高于其他阶段,1 龄若蚜表达量显著低于其他阶段,2 龄和 4 龄若蚜以及无翅成蚜表达量差异不显著。

禾谷缢管蚜吡虫啉抗性品系中,*RhpaABCG9* 表达量为敏感品系的 1.16 倍,与敏感品系差异不显著;*RhpaABCG20* 和 *RhpaABCG23* 表达量分别为敏感

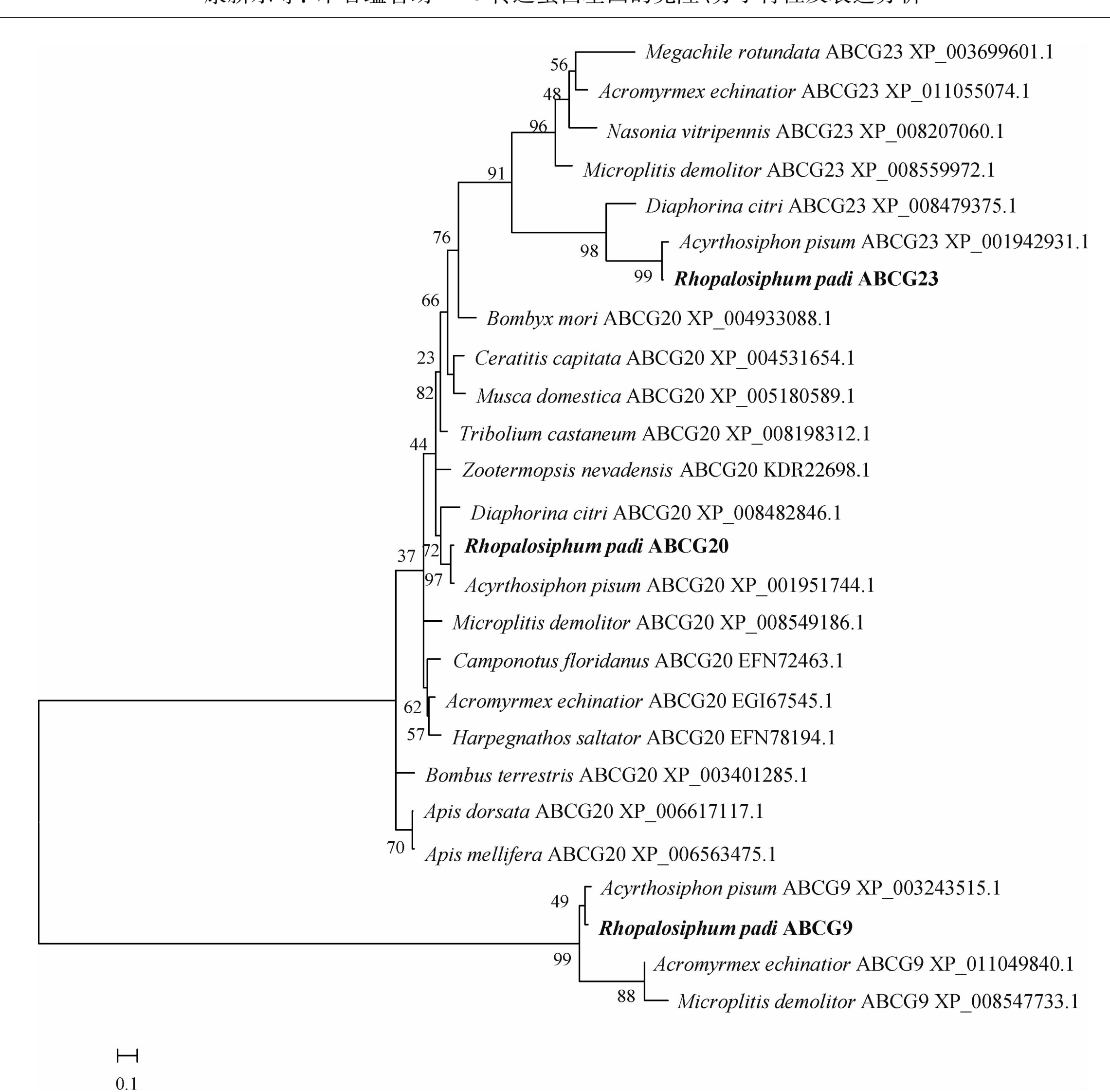


图 1　基于氨基酸序列构建的禾谷缢管蚜 RhpaABCG9，RhpaABCG20 和 RhpaABCG23 与其他昆虫 ABC 转运蛋白的系统进化树（NJ 法）

Fig. 1　Phylogenetic tree of RhpaABCG9, RhpaABCG20 and RhpaABCG23 from *Rhopalsiphum padi* and the ABC transporters from other insect species based on the amino acid sequence (NJ method)

进化树分支上数值表示 1 000 次循环检验的置信度，标尺示遗传距离，拉丁学名后为 GenBank 登录号。Numbers above branches support values (%) based on 1 000 replicates are indicated, the scale bar represents 0.1% amino acid substitutions per site, and the GenBank accession numbers are behind the Latin names.

品系表达量的 4.60 和 4.45 倍，且显著高于敏感品系（图 3）；禾谷缢管蚜异丙威抗性品系中，*RhpaABCG20* 表达量为敏感品系表达量的 1.62 倍，显著高于敏感品系，而 *RhpaABCG9* 和 *RhpaABCG23* 2 个基因表达量分别为敏感品系的 0.75 和 0.83 倍，与敏感品系差异不显著（图 3）。

3　讨论

本研究克隆了禾谷缢管蚜 ABC 转运蛋白 3 个基因 *RhpaABCG9*，*RhpaABCG20* 和 *RhpaABCG23*，序列分析表明，其编码的 3 个蛋白均具有 ABC 转运蛋白的典型特征序列。系统发育分析发现，RhpaABCG20 和 RhpaABCG23 之间进化关系较近，而二者与 RhpaABCG9 进化关系较远。*RhpaABCG9*，*RhpaABCG20* 和 *RhpaABCG23* 在禾谷缢管蚜不同发育时期和不同抗药性品系中具有不同的表达特点。

人类 ABCG2 蛋白（乳腺癌耐药蛋白）具有广泛的底物特异性，被称为多药外排泵（Tarr *et al*., 2009；Kerr *et al*., 2011），节肢动物 ABCGs 也被认为在外源化学物质的抗性方面起作用（Buss and Callaghan, 2008；Labbé *et al*., 2011）。本研究分析

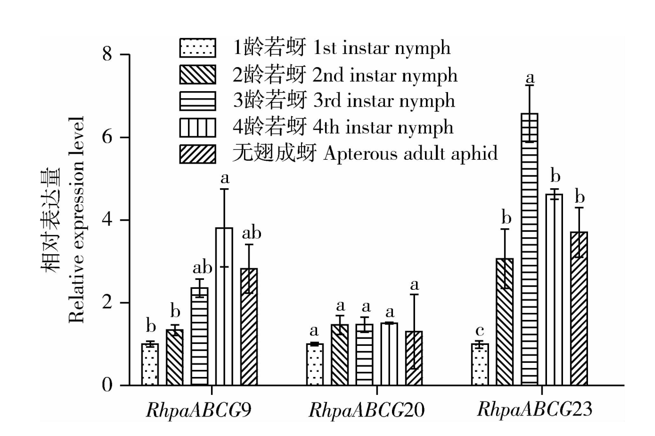


图 2 禾谷缢管蚜不同发育阶段 *RhpaABCG9*, *RhpaABCG20* 和 *RhpaABCG23* 的相对表达水平

Fig. 2 Relative expression levels of *RhpaABCG9*, *RhpaABCG20* and *RhpaABCG23* at different developmental stages of *Rhopalosiphum padi*

图中数据为 3 次生物学重复的平均值 ± 标准误;柱上不同字母表示同一基因不同发育时期基因表达水平在 0.05 水平上有显著差异(邓肯氏新复极差检验)。Data are shown as means ± *SE* of three replicates. Different letters above bars indicate significant difference in the expression level of the same gene among different developmental stages at the 0.05 level (Duncan's multiple range test).

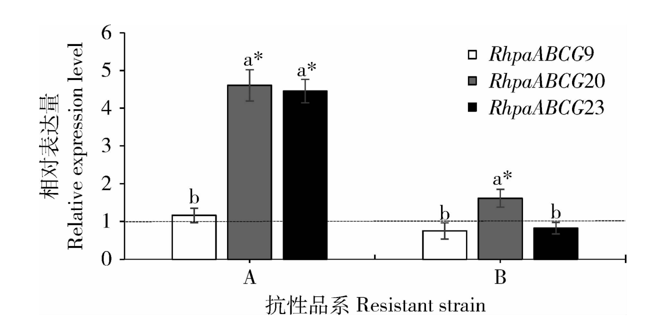


图 3 禾谷缢管蚜 *RhpaABCG9*, *RhpaABCG20* 和 *RhpaABCG23* 在不同抗性品系无翅成蚜中相对表达量

Fig. 3 Relative expression levels of *RhpaABCG9*, *RhpaABCG20* and *RhpaABCG23* in apterous adults of different insecticide resistant strains of *Rhopalosiphum padi*

A: 吡虫啉抗性品系 Imidacloprid resistant strain; B: 异丙威抗性品系 Isoprocarb resistant strain; $Y = 1.0$ 的虚线表示敏感品系 3 个基因的表达量 The expression level of the three genes in the susceptible strain is marked with a dash line at $Y = 1.0$. 图中数据为 3 次生物学重复的平均值 ± 标准误;柱上不同字母表示同一品系不同基因表达水平在 0.05 水平上有显著差异(邓肯氏新复极差检验);柱上星号表示该处理组与对照组差异显著(t 检验, $P < 0.05$)。Data are shown as means ± *SE* of three replicates. Different letters above bars indicate significant difference in the expression level of different genes in the same strain at the 0.05 level (Duncan's multiple comparison test). The asterisk above bars indicates significant difference between treatment and the corresponding control (t-test, $P < 0.05$).

了禾谷缢管蚜 3 个 ABC 转运蛋白基因在不同发育时期和两个抗性品系的表达水平,结果显示,*RhpaABCG9*,*RhpaABCG20* 和 *RhpaABCG23* 3 个基因在禾谷缢管蚜不同发育时期均有不同程度的表达,并在 3 -4 龄若蚜阶段表达最高,这可能是随着蚜虫取食量的增加,需要转运的物质增多,进而表达出更多的 ABC 转运蛋白,*RhpaABCG20* 在各个发育时期表达变化不显著,可能与禾谷缢管蚜其他的生理功能有关,需要进一步研究。在昆虫的不同发育时期,不同 ABC 转运蛋白基因的表达量以及其对外源物质跨膜运输的能力会发生变化。杨帆(2013)通过荧光实时定量 PCR 的方法,比较了 HaABCC2 基因在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 不同发育阶段的表达情况,结果表明,该基因在棉铃虫整个发育阶段均有表达,在 5 龄幼虫阶段表达量最高,其次是 3 -4 龄幼虫阶段,成虫期的表达量最低,其原因可能是棉铃虫在幼虫期大量取食,随着取食量的增加而表达出更多的转运蛋白 ABCC2。在禾谷缢管蚜异丙威抗性品系和吡虫啉抗性品系中,3 个基因的表达模式不同,说明 ABC 转运蛋白在介导禾谷缢管蚜对不同杀虫剂的跨膜运输与抗性的品系有关,其具体机制有待进一步阐明。研究显示,有些昆虫的抗药性品系中,ABC 转运蛋白的表达量增加。You 等(2013)发现小菜蛾 ABC 转运蛋白 CCG014955.1 基因在毒死蜱和氟虫腈抗性品系中表达量分别为敏感品系的 9.1 和 6.36 倍,共有 8 个 ABC 转运蛋白基因在毒死蜱抗性品系中表达量高达敏感品系 4 倍以上,另外 9 个 ABC 转运蛋白基因在毒死蜱抗性品系的表达量为敏感品系的 2 ~4 倍;在小菜蛾氟虫腈抗性品系中,3 个 ABC 转运蛋白基因表达量高达敏感品系 4 倍以上,14 个 ABC 转运蛋白基因的表达量为敏感品系的 2 ~4 倍。Bariami 等(2012)发现埃及伊蚊拟除虫菊酯抗性品系中,ABCB,ABCC 和 ABCG 亚家族基因表达增加,其中 AAEL006717 蛋白基因在拟除虫菊酯开曼抗性种群和古巴抗性种群中的表达量分别为敏感品系的 5 倍和 2 倍。Yang 等(2013)在烟粉虱噻虫嗪抗性品系中,ABCG4 基因表达上调,其中 22 个编码 ABC 转运蛋白的 EST 在成虫体内表达上调,但是有 8 个编码 ABC 转运蛋白的 EST 在卵和幼虫体内表达却是下调的。Silva 等(2012)在桃蚜抗蚜威抗性品系中,成蚜 ABCG4 和 ABCG23 基因表达上调。Pedra 等(2004)在黑腹果蝇 DDT 抗性品系中,ABCG 亚家族基因表达量也会增加。通过昆虫主要解毒酶家族的研究,发现 ABC 转运蛋白基因

的扩增是昆虫对杀虫剂产生代谢抗性的一个重要机制。然而，并非所有的昆虫在药剂胁迫后 ABC 转运蛋白基因表达量都会增加。Epis 等(2014)研究表明，用氯菊酯 LD_{50} 剂量处理斯蒂文按蚊 *Anopheles stephensi* 幼虫后，5 个 ABC 转运蛋白基因(*AnstABCB2*，*AnstABCB3*，*AnstABCB4*，*AnstABCmember6* 和 *AnstABCG4*)中只有 *AnstABCG4* 表达上调，其余 4 个基因表达均下调。Jones 等(2012)在阿拉伯按蚊 DDT 抗性品系 DSSBA RES 中，*ABCG4* 的表达量比对照品系 DSSBA CON 高约 5 倍，在抗性品系中，有 6 个 ABC 转运蛋白基因表达量上升，同时也存在 6 个 ABC 转运蛋白基因表达量下调。

禾谷缢管蚜体内还有其他 ABC 转运蛋白基因，在下一步的研究工作中，应该分析禾谷缢管蚜其他 ABC 转运蛋白基因表达量的变化与其抗药性的关系，并分析 ABC 转运蛋白与其他解毒酶系(细胞色素 P450 单加氧酶、羧酸酯酶和谷胱甘肽 S-转移酶)基因表达变化的关系，从而深入阐明禾谷缢管蚜代谢抗性的机理。目前的相关研究中，ABCB FTs，ABCCs 和 ABCGs 是报道最多的参与害虫体内农药运输及抗药性产生的 ABC 转运蛋白亚家族，昆虫抗药性相关的研究大多分析 ABC 转运蛋白基因在转录水平和蛋白质水平的变化，研究 ABC 转运蛋白抑制剂协同作用的报道较少，在下一步的工作中，应该结合 RNA 干扰技术和 ABC 转运蛋白抑制剂开展研究。禾谷缢管蚜是重要的农业害虫，对多种化学农药产生了抗药性，本研究对于深入阐明禾谷缢管蚜的抗药性机制，以及该虫的抗药性治理与综合防治具有重要意义。

参考文献(References)

Abo-Elghar GE, Fujiyoshi P, Matsumura F, 2004. Significance of the sulfonylurea receptor (SUR) as the target of diflubenzuron in chitin synthesis inhibition in *Drosophila melanogaster* and *Blattella germanica*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(8): 743–752.

Ardelli BF, 2013. Transport proteins of the ABC systems superfamily and their role in drug action and resistance in nematodes. *Parasitology International*, 62(6): 639–646.

Bariami V, Jones CM, Poupardin R, Vontas J, Ranson H, 2012. Gene amplification, ABC transporters and cytochrome P450s: unraveling the molecular basis of pyrethroid resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(6): e1692.

Broehan G, Kroeger T, Lorenzen M, Merzendorfer H, 2013. Functional analysis of the ATP-binding cassette (ABC) transporter gene family of *Tribolium castaneum*. *BMC Genomics*, 14: 6.

Buss DS, Callaghan A, 2008. Interaction of pesticides with p-glycoprotein and other ABC proteins: a survey of the possible importance to insecticide, herbicide and fungicide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 90(3): 141–153.

Chen MH, Han ZJ, 2006. Cloning and sequence analysis of 2 different acetylcholinesterase genes in *Rhopalosiphum padi* and *Sitobion avenae*. *Genome*, 49(3): 239–243.

Dean M, Hamon Y, Chimini G, 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research*, 42(7): 1007–1017.

Deeley RG, Westlake C, Cole SPC, 2006. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiological Reviews*, 86(3): 849–899.

Dermauw W, Osborne EJ, Clark RM, Grbi M, Tirry L, Van Leeuwen T, 2013. A burst of ABC genes in the genome of the polyphagous spider mite *Tetranychus urticae*. *BMC Genomics*, 14: 317.

Dermauw W, Van Leeuwen T, 2014. The ABC gene family in arthropods: comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 45: 89–110.

Epis S, Porretta D, Mastrantonio V, Comandatore F, Sassera D, Rossi P, Cafarchia C, Otranto D, Favia G, Genchi C, Bandi C, Urbanelli S, 2014. ABC transporters are involved in defense against permethrin insecticide in the malaria vector *Anopheles stephensi*. *Parasites & Vectors*, 7: 349.

Ewart GD, Howells AJ, 1998. ABC transporters involved in transport of eye pigment precursors in *Drosophila melanogaster*. *Methods in Enzymology*, 292: 213–224.

George AM, Jones PM, 2012. Perspectives on the structure-function of ABC transporters: the switch and constant contact models. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 109(3): 95–107.

Higgins CF, 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology*, 8: 67–113.

Higgins CF, Linton KJ, 2004. The ATP switch model for ABC transporters. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(10): 918–926.

Jones CM, Toé HK, Sanou A, Namountougou M, Hughes A, Diabaté A, Dabiré R, Simard F, Ranson H, 2012. Additional selection for insecticide resistance in urban malaria vectors: DDT resistance in *Anopheles arabiensis* from Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *PLoS ONE*, 7(9): e45995.

Kartner N, Evernden-porelle D, Bradley G, Ling V, 1985. Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies. *Nature*, 316(6031): 820–823.

Kerr ID, Haider AJ, Gelissen IC, 2011. The ABCG family of membrane-associated transporters: you don't have to be big to be mighty. *British Journal of Pharmacology*, 164(7): 1767–1779.

Labbé R, Caveney S, Donly C, 2011. Genetic analysis of the xenobiotic resistance-associated *ABC* gene subfamilies of the Lepidoptera. *Insect Molecular Biology*, 20(2): 243–256.

Lee SH, Kang JS, Min JS, Yoon KS, Strycharz JP, Johnson R, Mittapalli O, Margam VM, Sun W, Li HM, Xie J, Wu J, Kirkness

EF, Berenbaum MR, Pittendrigh BR, Clark JM, 2010. Decreased detoxification genes and genome size make the human body louse an efficient model to study xenobiotic metabolism. *Insect Molecular Biology*, 19(5): 599 – 615.

Lespine A, Ménez C, Bourguinat C, Prichard RK, 2012. P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2: 58 – 75.

Linton KJ, Higgins CF, 2007. Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology*, 453(5): 555 – 567.

Liu S, Zhou S, Tian L, Guo E, Luan Y, Zhang J, Li S, 2011. Genome-wide identification and characterization of ATP-binding cassette transporters in the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 12: 491.

Pardo-López L, Soberón M, Bravo A, 2013. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(1): 3 – 22.

Pedra JHF, McIntyre LM, Scharf ME, Pittendrigh BR, 2004. Genome-wide transcription profile of field- and laboratory-selected dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)-resistant *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(18): 7034 – 7039.

Popovic M, Zaja R, Loncar J, Smital T, 2010. A novel ABC transporter: the first insight into zebrafish (*Danio rerio*) ABCH1. *Marine Environmental Research*, 69: S11 – S13.

Rees DC, Johnson E, Lewinson O, 2009. ABC transporters: the power to change. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(3): 218 – 227.

Riordan JR, Deuchars K, Kartnerv N, Alon N, Trent J, Ling V, 1985. Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature*, 316(6031): 817 – 819.

Roth CW, Holm I, Graille M, Dehoux P, Rzhetsky A, Wincker P, Weissenbach J, Brey PT, 2003. Identification of the *Anopheles gambiae* ATP-binding cassette transporter superfamily genes. *Molecules and Cells*, 15(2): 150 – 158.

Schmittgen TD, Livak KJ, 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature Protocols*, 3(6): 1101 – 1108.

Silva AX, Jander G, Samaniego H, Ramsey JS, Figueroa CC, 2012. Insecticide resistance mechanisms in the green peach aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) I: a transcriptomic survey. *PLoS ONE*, 7(6): e36366.

Simon JC, Blackman RL, Le Gallic JF, 1991. Local variability in the life cycle of the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) in western France. *Bulletin of Entomological Research*, 81(3): 315 – 322.

Sturm A, Cunningham P, Dean M, 2009. The ABC transporter gene family of *Daphnia pulex*. *BMC Genomics*, 10: 170.

Tarr PT, Tarling EJ, Bojanic DD, Edwards PA, Baldán Á, 2009. Emerging new paradigms for ABCG transporters. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)*, 1791(7): 584 – 593.

Tatematsu K, Yamamoto K, Uchino K, Narukawa J, Iizuka T, Banno Y, Katsuma S, Shimada T, Tamura T, Sezutsu H, Daimon T, 2011. Positional cloning of silkworm *white egg* 2 (*w*-2) locus shows functional conservation and diversification of ABC transporters for pigmentation in insects. *Genes to Cells*, 16(4): 331 – 342.

Yang F, 2013. Molecular Cloning and mRNA Expression of *HaABCC*2 Gene in *Helicoverpa armigera*. MSc Thesis, Nanjing Agricultural University, Nanjing. [杨帆, 2013. 棉铃虫 HaABCC2 基因克隆及 mRNA 表达. 南京: 南京农业大学硕士学位论文]

Yang N, Xie W, Yang X, Wang S, Wu Q, Li R, Pan H, Liu B, Shi X, Fang Y, Xu B, Zhou X, Zhang Y, 2013. Transcriptomic and proteomic responses of sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, to thiamethoxam. *PLoS ONE*, 8(5): e61820.

You M, Yue Z, He W, Yang X, Yang G, Xie M, Zhan D, Baxter SW, Vasseur L, Gurr GM, Douglas CJ, Bai J, Wang P, Cui K, Huang S, Li X, Zhou Q, Wu Z, Chen Q, Liu C, Wang B, Li X, Xu X, Lu C, Hu M, Davey JW, Smith SM, Chen M, Xia X, Tang W, Ke F, Zheng D, Hu Y, Song F, You Y, Ma X, Peng L, Zheng Y, Liang Y, Chen Y, Yu L, Zhang Y, Liu Y, Li G, Fang L, Li J, Zhou X, Luo Y, Gou C, Wang J, Wang J, Yang H, Wang J, 2013. A heterozygous moth genome provides insights into herbivory and detoxification. *Nature Genetics*, 45(2): 220 – 225.

(责任编辑: 袁德成)